

# Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum *Penicillium* sp. Terhadap Aktivitas Enzim Selulase pada Medium Tongkol Jagung

Azizah Rahayu, Nengah Dwianita Kuswytasari

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)

Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia

e-mail: kuswytasari@bio.its.ac.id

**Abstrak**— Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas enzim selulase dengan variasi masa inkubasi (4 hari, 8 hari, 12 hari, 16 hari dan 20 hari) dan konsentrasi inokulum yang berbeda (10%, 15% dan 20%) dengan isolat *Penicillium* sp.. Jenis enzim selulase yang diukur adalah aktivitas enzim endoglukanase, eksoglukanase dan Fp-ase dengan menggunakan metode DNS dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada jenis medium pertama, aktivitas enzim paling optimum adalah pada aktivitas enzim Fp-ase pada konsentrasi inokulum 20% dengan masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,2619 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4. Sedangkan pada jenis medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke 16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16.

**Kata Kunci**— aktivitas enzim selulase, konsentrasi inokulum, masa inkubasi, *Penicillium* sp., selulosa.

## I. PENDAHULUAN

Selulase merupakan enzim ekstraseluler yang diekskresikan kapang pada media produksinya. Selulase dapat digunakan secara luas dalam industri tekstil, deterjen, pulp maupun kertas. Selulase juga dapat digunakan dalam pengolahan kopi [1]. Selain itu, selulase dapat dimanfaatkan dalam proses inkubasi menjadi biofuel, seperti bioethanol [2].

Dengan banyaknya kebutuhan terhadap enzim selulase, maka perlu ditemukan sumber penghasil enzim selulase. Produksi enzim selulase secara komersial biasanya menggunakan fungi atau bakteri. Pemilihan mikroba sebagai sumber enzim mempunyai beberapa keuntungan. Diantara keuntungan tersebut adalah sistem produksi mikroba dapat diperoleh di bawah kontrol tertutup, produktivitas enzim dapat dimanipulasi

secara lingkungan dan genetika, serta metode pengkayaan untuk sistem mikroba cukup sederhana [3].

Indonesia menghasilkan limbah lignoselulosa dari pertanian seperti jagung dan padi dengan produksi tanaman jagung sebesar 18,83 juta ton/tahun dan produksi padi sebesar 69 juta ton/tahun pada tahun 2012-2013. Limbah dari hasil pertanian tersebut memiliki komponen utama lignoselulosa yang terdiri atas selulosa, hemiselulosa dan lignin. Dengan banyaknya kandungan lignoselulosa terutama selulosa, maka bahan-bahan tersebut sangat potensial jika dimanfaatkan untuk memproduksi enzim selulase. Seperti pada tongkol jagung yang mengandung selulosa sebanyak 41%, hemiselulosa 36% dan lignin 6% [4].

## II. METODE PENELITIAN

### A. Tahap Persiapan

Isolat kapang yang digunakan dalam Penelitian Tugas Akhir ini adalah isolat kapang *Penicillium* sp. 2 yang didapatkan dari koleksi kultur murni Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi ITS. Isolat kapang diisolasi dari kawasan pesisir Wonorejo Surabaya oleh peneliti sebelumnya [5].

### B. Tahap Pretreatment Limbah Tongkol Jagung

Limbah pertanian yang digunakan adalah tongkol jagung yang diberi perlakuan sebelum digunakan sebagai medium pertumbuhan kapang. Tahap *pretreatment* pada limbah ini terdiri dari tahap *pretreatment* secara mekanik dan kimiawi.

Tahap *pretreatment* secara mekanik yaitu dengan mengeringkan limbah di bawah sinar matahari, yang dipotong menjadi berukuran  $\pm 1$  cm dan digiling dengan mesin penggiling [6]. Kemudian dioven pada suhu 75°C selama 48 jam [7]. Sedangkan pada *pretreatment* secara kimiawi, substrat limbah ditambahkan NaOH 2% dengan perbandingan 1:10, lalu dipanaskan pada suhu 85°C selama 6 jam [6,8]. Kemudian padatan disaring dan dibilas dengan air panas hingga pH substrat menjadi 7 [6, 7, 9, 10].

### C. Tahap Pembuatan Medium Basal Pertumbuhan

Medium basal pertumbuhan terdiri dari garam mineral dan nitrogen untuk meningkatkan produksi enzim, dengan komposisi sebagai berikut :



Tabel 1.  
Komposisi medium basal pertumbuhan

Zat	Komposisi g/L aquades
Yeast Ekstrak	1,4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,34
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,3
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,0016
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,005
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,0014
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,002

#### D. Preparasi Starter dan Optimasi Enzim Selulase

Pembuatan starter *Penicillium* sp. dimulai dengan mensuspensikan kultur *Penicillium* yang berusia 7 hari pada medium PDA dengan menambahkan 10 ml aquades steril. Suspensi jamur diinokulasikan sebanyak 10% [6] dari total medium (2,5 g substrat limbah tongkol jagung dan 12,5 ml medium basal pertumbuhan yang telah disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit). Kemudian diinkubasi pada suhu ruangan sampai miselium penuh.

Sedangkan pada tahap optimasi enzim, digunakan medium dengan komposisi 5 g substrat limbah tongkol jagung dan 25 ml medium basal pertumbuhan [6]. Medium diatur pada pH 6 [11]. Selanjutnya inokulum diinokulasikan sebanyak 10%, 15% dan 20% dari total medium dengan variasi masa inkubasi 4; 8; 12; 16 dan 20 hari. Inkubasi dikondisikan pada suhu 35°C [11].

#### E. Ekstraksi dan Pengukuran Aktivitas Enzim

Ekstraksi enzim didapatkan dengan menambahkan larutan ekstrak tween 80 0,1% sebanyak 20 ml, kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm [6] dan ekstrak kasar enzim dapat disimpan dalam lemari pendingin. Selanjutnya, ekstrak kasar enzim digunakan untuk uji aktivitas enzim, yakni enzim endoglukanase, eksoglukanase dan Fp-ase dengan menggunakan substrat yang berbeda. Uji aktivitas enzim endoglukanase menggunakan substrat CMC, pada uji aktivitas enzim eksoglukanase menggunakan substrat avicel, sedangkan pada enzim Fp-ase digunakan kertas saring Whatman no.1 [12].

Kadar gula pereduksi diukur dengan menggunakan metode DNS [14] dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm yang dikonversikan dengan kurva standar glukosa dengan konsentrasi 0-2 mg/ml.

$$\text{Aktivitas enzim endoglukanase (U/ml)} = \frac{[\text{gula pereduksi}] \times V_1 \times 10^3 \text{ } \mu\text{mol}}{\text{BM} \times V_2 \times T}$$

Keterangan :

BM : berat molekul glukosa

V<sub>1</sub> : volume larutan (ml)

V<sub>2</sub> : volume enzim (ml)

T : masa inkubasi (menit)

Satu unit aktivitas enzim endoglukanase didefinisikan sebagai 1 μmol glukosa yang dilepaskan per menit [13].

#### F. Analisa Data

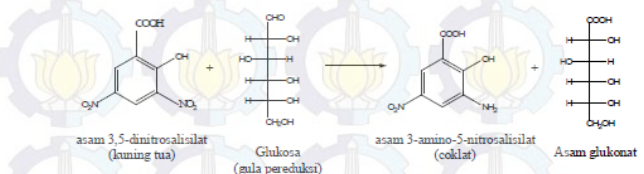
Data penelitian ini dianalisa menggunakan metode deskriptif kuantitatif. Uji aktivitas enzim dilakukan untuk melihat pengaruh perlakuan terhadap aktivitas enzim selulase pada variasi lama inkubasi dan konsentrasi inokulum yang berbeda.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium basal pertumbuhan yang mengandung yeast ekstrak yang berfungsi sebagai sumber nitrogen dan glukosa, yang merupakan sumber karbon sederhana yang dapat diabsorpsi langsung oleh sel dan digunakan dalam pembentukan biomassa dimana dalam pembentukan biomassa ini diperlukan sumber karbon seperti mono dan disakarida.

Uji aktivitas endoglukanase menggunakan substrat CMC. CMC merupakan jenis substrat untuk uji aktivitas enzim endo-1,4-β-D-glukanase. Enzim endoglukanase akan mendegradasi CMC menjadi selulodekstrin yang merupakan gula pereduksi dengan menghidrolisis ikatan glikosidik β-1,4 secara acak, sehingga membentuk rantai yang terbuka untuk aktivitas enzim eksoglukanase. Enzim eksoglukanase bekerja menghidrolisis selulosa kristal (avicel), selulodekstrin (produk enzim endoglukanase) menghasilkan produk utama selobiosa. Pada uji aktivitas enzim *filter paperase* digunakan substrat kertas filter Whatman no.1 [12].

Pada saat pengukuran gula pereduksi dengan menggunakan DNS, gula pereduksi ini akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat (warna kuning tua) menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat (berwarna coklat).

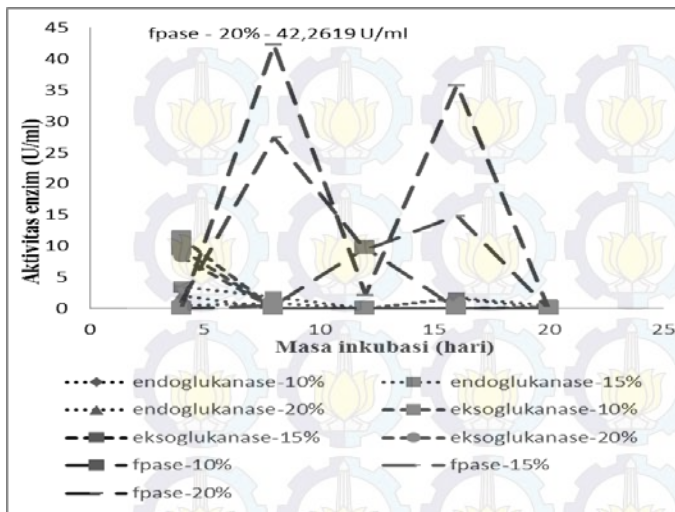


Gambar 1. Reaksi DNS dengan gula pereduksi, dimana gula pereduksi akan mereduksi asam 3,5-dinitrosalisilat menjadi asam 3-amino-5-nitrosalisilat.

Pengukuran aktivitas enzim selulase didasarkan pada variasi lama inkubasi dan konsentrasi inokulum dengan jenis medium tongkol jagung yang berbeda. Medium pertama yakni medium tongkol jagung dengan *treatment* mekanik dan kimiawi. Sedangkan jenis medium kedua adalah medium tongkol jagung dengan *treatment* mekanik saja.

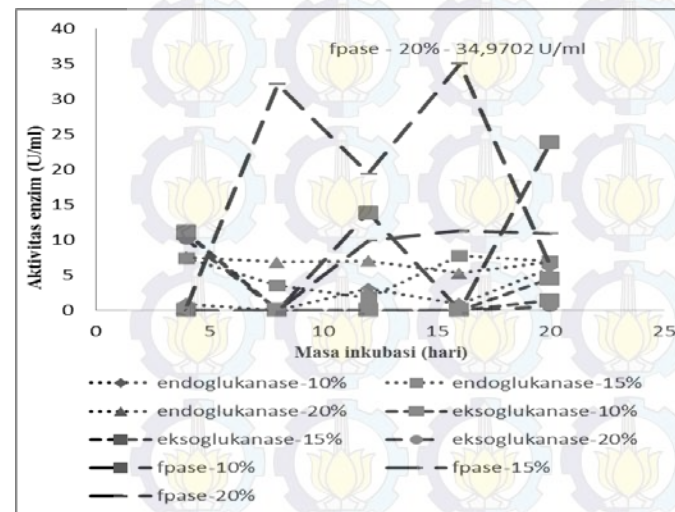
Berdasarkan Gambar 1, diperoleh bahwa pada medium pertama, aktivitas enzim yang paling optimum adalah aktivitas enzim Fp-ase dengan konsentrasi 20% pada masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,2619 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4.





Gambar 2. Grafik aktivitas enzim endoglukanase, eksoglukanase dan Fp-ase pada medium pertama.

Sedangkan pada medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke 16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16 (Gambar 3).



Gambar 3. Grafik aktivitas enzim endoglukanase, eksoglukanase dan Fp-ase pada medium kedua.

Baik pada jenis medium pertama maupun pada medium kedua, aktivitas yang tertinggi sama-sama pada aktivitas enzim Fp-ase atau total aktivitas selulase. Dimana satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai 1  $\mu$ mol glukosa yang terbentuk selama satu menit pada pH 6 dan temperatur 35°C. Namun aktivitas pada medium pertama, lebih besar daripada pada medium kedua. Perbedaan nilai aktivitas ini dikarenakan adanya perbedaan pada mekanisme *treatment* yang dilakukan pada medium tongkol jagung. Medium pertama merupakan medium yang dilakukan dengan *treatment* kimiawi dan mekanik. Sedangkan medium kedua hanya dengan *treatment*

mekanik saja. Medium dengan *treatment* mekanik dan kimiawi menghasilkan aktivitas yang lebih besar dikarenakan penggunaan larutan NaOH yang menyebabkan pelonggaran diameter pori-pori selulosa, penurunan derajat kristalisasi dan polimerisasi, serta penghancuran struktur lignin.

Lama fase adaptasi pada mikroorganisme tergantung pada komposisi medium, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikroorganisme pada medium sebelumnya. Ketika sel telah menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru, maka sel mulai membelah hingga mencapai populasi yang maksimum menjadi lebih panjang, perkembang-biakan mikroorganisme menjadi lambat akibatnya biomassa sel yang terbentuk tidak maksimum dalam waktu singkat dan produksi enzim selulase menjadi terhambat. Jika jumlah inokulum lebih besar, maka akan terjadi kompetisi untuk mendapatkan nutrisi didalam proses fermentasi akibatnya biomassa yang terbentuk tidak maksimum sehingga produksi selulase menjadi berkurang [14].

Jumlah inokulum yang tidak sebanding dengan jumlah substrat, hal ini mendorong kapang masuk ke dalam fase stasioner (laju pertumbuhannya sama dengan laju kematiannya). Aktivitas enzim akan menurun pada saat kapang memasuki fase stasioner [15]. Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi inokulum merupakan faktor yang paling penting untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produksi enzim [16].

#### IV. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa pada jenis medium pertama, aktivitas enzim paling optimum adalah pada aktivitas enzim Fp-ase pada konsentrasi inokulum 20% dengan masa inkubasi hari ke 8 sebesar 42,2619 U/ml. Diikuti dengan aktivitas eksoglukanase yakni 11,3525 U/ml pada konsentrasi 10% dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 3,4904 U/ml pada konsentrasi inokulum 15% dengan masa inkubasi hari ke 4. Sedangkan pada jenis medium kedua, aktivitas Fp-ase adalah yang tertinggi, yakni pada konsentrasi 20% dengan masa inkubasi hari ke 16 sebesar 34,9702 U/ml. Diikuti dengan aktivitas enzim eksoglukanase 11,1408 U/ml yang optimum pada konsentrasi 15% dengan masa inkubasi hari ke 4 dan aktivitas enzim endoglukanase sebesar 7,7066 U/ml dengan konsentrasi inokulum 15% pada masa inkubasi hari ke 16.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] W.C. Frazier, and Westhoff D.C., *Food Microbiology*, 4th ed, New York, Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited (1988).
- [2] Fan Zhiliang, and R. Lynd Lee, "Conversion Of Paper Sludge To Ethanol," *Bioprocess Biosyst Eng* (2006) 30: 35.
- [3] M.W. Fowler, "Enzyme Technology in Biotechnology for Engineers," *Biological System in Technological Processes*, New York, John Wiley & Sons (1988).
- [4] T.T. Irawadi, *Produksi Enzim Ekstraseluler (Selulosa dan Xilanase) dari Neurospora sitophila pada Substrat Limbah Padat Kelapa Sawit*, Disertasi, Bogor: Pasca Sarjana, IPB (1991).
- [5] N.D. Kuswytasari, M.Shovitri, and R.D. Andriyadi, *Soil Mold Diversity in The Coastal Wonorejo Surabaya*, Proceeding International Conference on Mathematic and Sciences, Surabaya: ITS Press (2011).
- [6] N. Anwar, W. Arief, and W. Sugeng, "Peningkatan Unjuk Kerja Hidrolisis Enzimatik Jerami Padi Menggunakan Campuran Selulase



- Kasar dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*,” Makara Sains (2010) 14: 114-115.
- [7] Y. Sun, and J. Cheng, “Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production,” *Bioresour Technol* (2002) 83: 1-11.
- [8] M. Pradeep Reddi, and G. Narashimha, “Utilization of Pea Seed Husk As Substrate for Cellulase Production by Mutant *Aspergillus niger*,” *Insight Biotechnology* (2011) 1: 18.
- [9] Rurry Patradhiani, I.S. Utami, and A. Widjaja, *Studi Bahan Baku Berlignoselulosa dari Limbah Pertanian untuk Produksi Gula Xilosa Murah Diikuti Proses Fermentasi Menghasilkan Etanol*, Seminar Rekayasa Kimia dan Proses, Universitas Diponegoro (2010).
- [10] O.J. Sanchez, and C.A. Cardona, “Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks,” *Bioresour Technol* (2008) 99: 5270-5295.
- [11] I. Alfiah, *Produksi Enzim Selulase Oleh Penicillium sp. Pada Suhu, pH dan Limbah Pertanian yang Berbeda*, Tugas Akhir, Surabaya: Jurusan Biologi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (2012).
- [12] T.K. Ghose, “Measurement of Cellulose Activities,” *International Union of Pure and Applied Chemistry* (1987) 59: 257-268.
- [13] Iman Hidayat, *Pengaruh pH Terhadap Aktivitas Endo-1,4- $\beta$ -Glucanase Bacillus sp. AR 009*, Bogor: Bidang Mikrobiologi LIPI (2005).
- [14] K. Septiningrum, and A.P. Chandra, “Produksi Xilanase dari Tongkol Jagung dengan Sistem Bioproses Menggunakan Bacillus circulans untuk Pra-pemutihan Pulp,” *Jurnal Riset Industri* Vol. V, No. 1 (2011) 87-97.
- [15] E.J. Nahas, “Gen,” *Mikrobiol* (1988) 134-227.
- [16] C. Cai, Lou B. and Zheng X., “Keratinase Production and Keratin Degradation by Mutant Strains of Bacillus subtilis,” *Journal of Zhejiang University Science B* (2008) 60-67.